



ΠΑΡΑΔΟΤΕΟ: Π.4.4

«Ανάλυση-Ανακοίνωση αποτελεσμάτων (έκθεση)» (Δράση 4)

για το ΥΠΟΕΡΓΟ 1 της Πράξης:

**«ΘΑΛΗΣ- Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών-
Ωρίμανση της μη ειδικής ανοσίας: επιρροή των λοιμώξεων και ρόλος τους
στην ανάπτυξη ατοπίας και άσθματος» (MIS 377047)**

του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση»

Επιστημονικός Υπεύθυνος Πράξης και Υπεύθυνος Υποέργου 1:
Ανδρέακος Ευάγγελος

Επιμέλεια σύνταξης εγγράφου: ΟΜΑΔΑ ΥΠΟΕΡΓΟΥ 1

ΜΟΥΡΑΤΗΣ ΜΑΡΙΟΣ-ΑΓΓΕΛΟΣ

ΤΡΙΑΝΤΑΦΥΛΛΙΑ ΒΑΣΙΛΙΚΗ

ΑΝΔΡΕΑΚΟΣ ΕΥΑΓΓΕΛΟΣ

ΜΑΝΙΟΥΔΑΚΗ ΜΑΡΙΑ

ΗΛΙΟΠΟΥΛΟΣ ΙΩΑΝΝΗΣ

ΘΕΟΔΟΣΙΟΥ ΘΕΟΔΟΣΙΟΣ

ΣΑΛΑΓΙΑΝΝΗ ΜΑΡΙΑ

ΓΑΛΑΝΗ ΙΩΑΝΝΑ

ΚΟΛΤΣΙΔΑ ΟΥΡΑΝΙΑ

ΣΤΑΥΡΟΠΟΥΛΟΣ ΑΘΑΝΑΣΙΟΣ

ΠΑΥΛΟΠΟΥΛΟΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ



Η προαναφερθείσα συγχρηματοδοτούμενη πράξη ΕΚΤ-ΕΣΠΑ 2007-2013 έχει ως σκοπό να εξετάσει την υπόθεση ότι η ελαττωματική ωρίμανση της φυσικής ανοσίας νωρίς στη ζωή, επηρεαζόμενη από λοιμώξεις, συμβάλλει στην ανάπτυξη αλλεργικών παθήσεων του αναπνευστικού συστήματος.

Στόχοι της πράξης είναι να περιγραφεί η ωρίμανση της φυσικής ανοσίας σε υγιείς και ασθματικούς δότες, να διευκρινιστεί η επιρροή των λοιμώξεων στην ωρίμανση της φυσικής ανοσίας και την ανάπτυξη/επιμονή αλλεργικών αντιδράσεων στους αεραγωγούς, να προσδιοριστεί η συσχέτιση ιϊκών λοιμώξεων με τη μικροβιακή αποικιοποίηση του ανώτερου αναπνευστικού και να αποσαφηνιστεί ο ρόλος του αναπνευστικού επιθηλίου και την αναδόμησης των αεραγωγών στην ανάπτυξη αλλεργίας και άσθματος. Σκοπός του προγράμματος είναι να αποκαλύψει σημαντικές βιολογικές διαδικασίες που ενεργοποιούνται στα πρώτα στάδια της ζωής και συμβάλλουν στην ανάπτυξη αλλεργικών παθήσεων του αναπνευστικού συστήματος με σημαντική διαγνωστική και θεραπευτική σημασία.

Στο πλαίσιο της πράξης, υλοποιείται το Υποέργο 1 με τίτλο «Ωρίμανση της μη-ειδικής ανοσίας: επιρροή των λοιμώξεων και ρόλος τους στην ανάπτυξη ατοπίας και άσθματος» και θα εκτελεστούν οκτώ (8) Δράσεις.

Το παρόν παραδοτέο 4.4 αποτελεί μέρος της **Δράσης 4: «Ρόλος των ιϊκών λοιμώξεων στην ωρίμανση της φυσικής ανοσίας στους μύες»** και περιλαμβάνει την μελέτη της ωρίμανσης της μη ειδικής ανοσίας σε σχέση με την ηλικία όπως αναλύεται παρακάτω.

Δράση 4: «Ρόλος των ιϊκών λοιμώξεων στην ωρίμανση της φυσικής ανοσίας στους μύες»

4.4 Ανάλυση-Ανακοίνωση αποτελεσμάτων

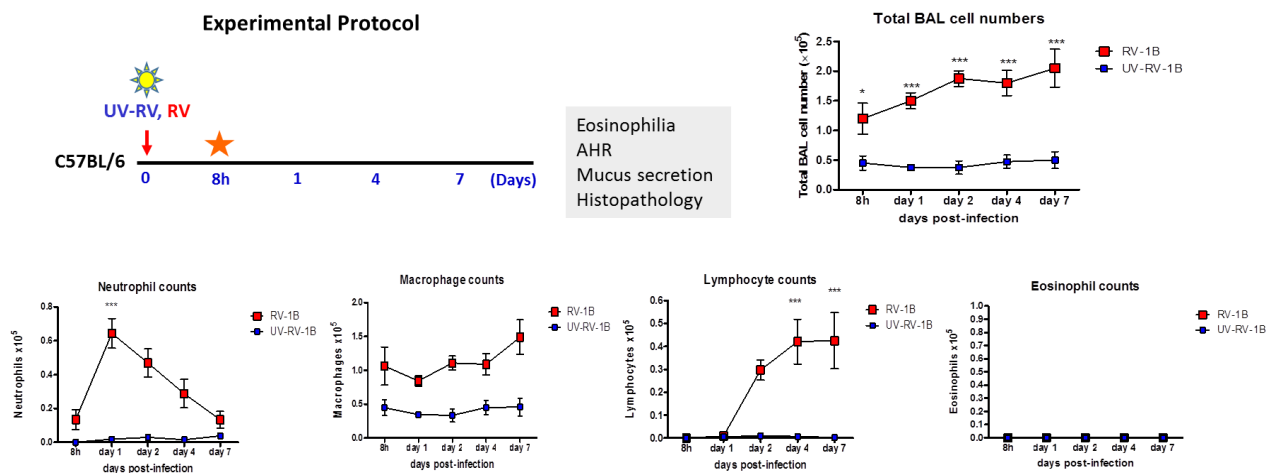
Το άσθμα και η ρινίτιδα αποτελούν ένα μείζον και ολοένα αυξανόμενο πρόβλημα δημόσιας υγείας στην Ευρώπη. Στην Ελλάδα υποφέρουν από αυτές τις νόσους περισσότεροι από 1.000.000 άνθρωποι, από τους οποίους μεγάλο μέρος είναι παιδιά. Κύριο προδιαθετικό παράγοντα για την εκδήλωση άσθματος και ρινίτιδας αποτελούν οι ιογενείς λοιμώξεις κατά την παιδική ηλικία, αν και ο τρόπος με τον οποίο συμβάλλουν σε αυτή τη διαδικασία παραμένει αδιευκρίνιστος. Το παρόν έργο εξετάζει την υπόθεση ότι οι ιογενείς λοιμώξεις αποσυντονίζουν τον εγγενή ρυθμό ωρίμανσης του ανοσιακού συστήματος προκαλώντας άστοχες ανοσιακές αντιδράσεις που εκφράζονται κλινικά ως αλλεργία. Μέρος αυτού του έργου αποτελεί και η Δράση 4: Ρόλος των ιϊκών λοιμώξεων στην ωρίμανση της φυσικής ανοσίας στους μύες.

Όπως και στους ανθρώπους, το ανοσοποιητικό σύστημα των μυών κατά τη βρεφική ηλικία είναι ανώριμο και ωριμάζει μέσα από μια σύνθετη και χρονοβόρα διαδικασία έκθεσης σε βακτήρια, ιούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες και αντιγόνα. Αντίστοιχα με τα ανθρώπινα ευρήματα, τα νεογνά των μυών αναπτύσσουν κυρίως

Th2 τύπου αποκρίσεις και παράγουν υψηλά επίπεδα IL-10, ενώ η έκκριση φλεγμονωδών κυτταροκινών όπως IL-12 και TNFα είναι ιδιαίτερα περιορισμένη. Η σταδιακή ωρίμανση του ανοσοποιητικού συστήματος έχει ως αποτέλεσμα την ενίσχυση των Th1 τύπου αποκρίσεων και φλεγμονωδών αντιδράσεων, καθώς και την ανάπτυξη ανοσιακής μνήμης. Παρόλη τη σημαντικότητα των μυών ως πειραματικών προτύπων για την προσομοίωση ανοσιακών και αλλεργικών αντιδράσεων και σχετιζόμενων νόσων, η πορεία ωρίμανσης του ανοσοποιητικού τους συστήματος παραμένει άγνωστη. Έτσι, παραμένει αδιευκρίνιστο πώς αναπτύσσονται αποκρίσεις της φυσικής και της επίκτητης/ειδικής ανοσίας στους μύες σε σχέση με την ηλικία, πώς επιδρούν σε αυτές διάφορες μικροβιακές λοιμώξεις, πώς επηρεάζεται η ειδική ανοσία, και αν τελικά αυτό συντελεί στη διαφοροποίηση της ωρίμανσης του ανοσοποιητικού συστήματος έτσι ώστε να προδιαθέτει για την ανάπτυξη αλλεργικών και χρόνιων φλεγμονωδών παθήσεων.

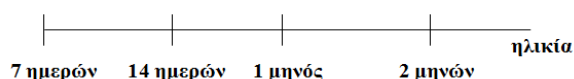
Στόχος της Δράσης 4 είναι να μελετηθεί η πορεία ωρίμανσης του ανοσοποιητικού συστήματος στους μύες, να χαρακτηριστεί η φυσική/μη-ειδική ανοσιακή απόκριση, η επίκτητη/ειδική ανοσιακή απόκριση και η επιρροή ιογενών ή βακτηριακών λοιμώξεων σε αυτή τη διαδικασία.

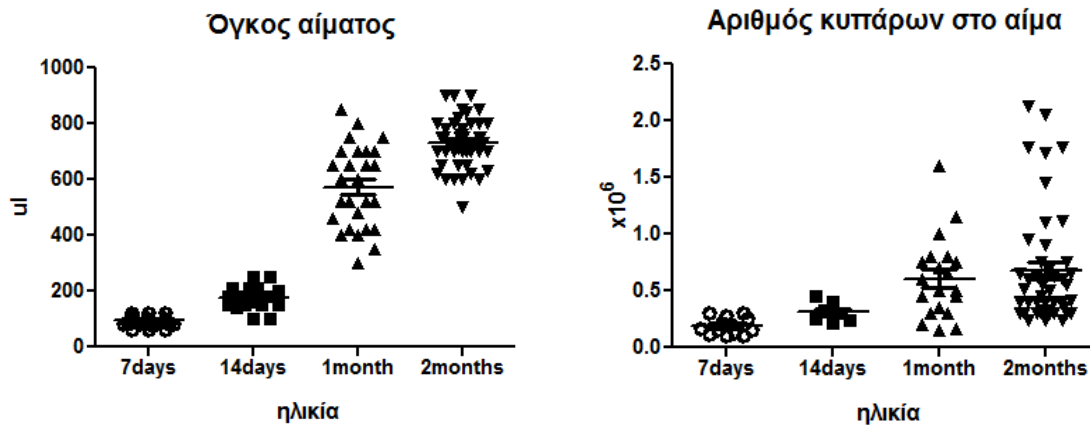
Στα πλαίσια αυτά συντάχθηκε, κατατέθηκε και εγκρίθηκε από την Υπηρεσία Κτηνιατρικής της Νομαρχίας Αθηνών το πειραματικό πρωτόκολλο για τη χορήγηση ρινοϊών στους μύες, αναπτύχθηκε πρότυπο ρινοϊκής λοίμωξης σε C57BL/6 και BALB/c μύες, στήθηκε η διαδικασία παραγωγής ρινοϊού στο εργαστήριο και βελτιστοποιήθηκε η ενδορινική χορήγηση ρινοϊού. Επίσης, αναπτύχθηκαν μεθοδολογίες για τη μελέτη ρινοϊκής λοίμωξης. Το παρών μοντέλο ρινοϊκής λοίμωξης στους μύες βασίζεται στη χορήγηση του στελέχους του ρινοϊού RV1b (rhinovirus minor group) στους μύες ενδορινικά υπό ελαφριά αναισθησία. Ο ιός προκαλεί φλεγμονή των αεραγωγών, με έντονη παρουσία ουδετεροφίλων στις 24 ώρες, η οποία ακολουθείται από διήθηση μονοπύρηνων φλεγμονοδών κυττάρων, όπως μακροφάγων και T λεμφοκυττάρων (Εικόνα 1). Αντίστοιχη είναι η εικόνα σε επίπεδο ιστού μετά από ιστολογική ανάλυση.



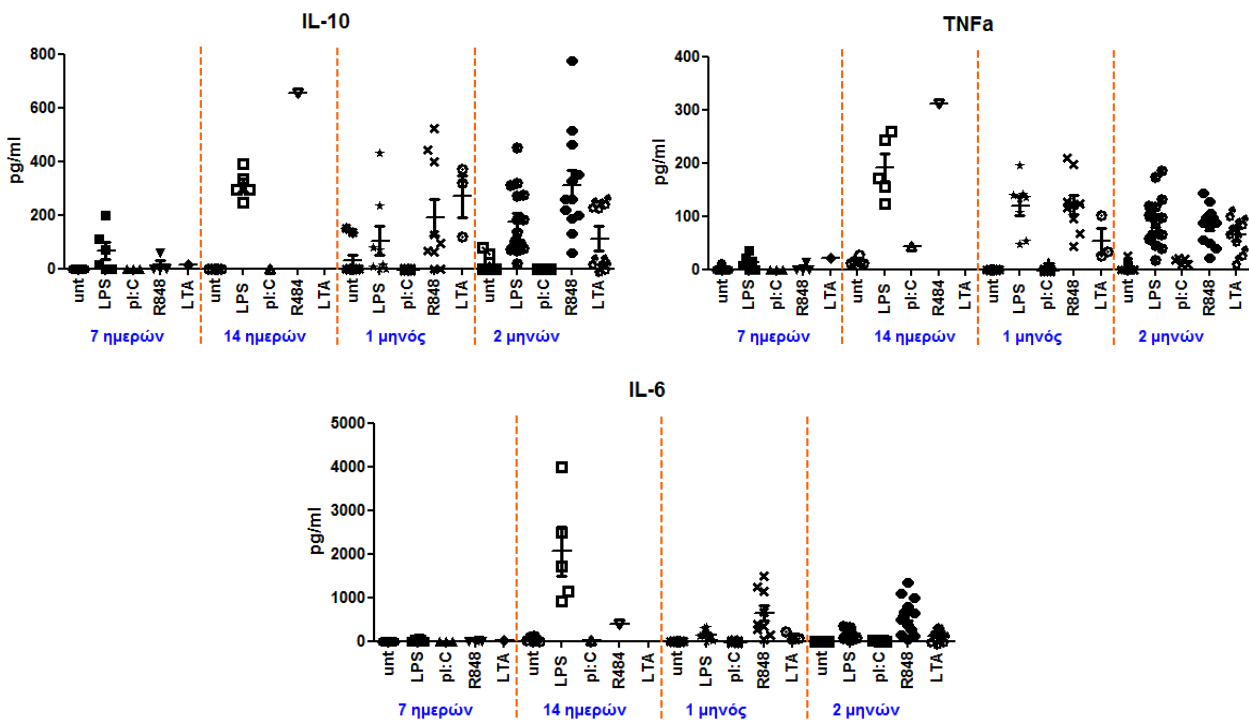
Εικόνα 1: Πρότυπο ρινοϊκής λοίμωξης στους μύες. BALB/c μύες εκτέθηκαν σε 10^7 TCID₅₀ ενεργό (RV) ή UV-απενεργοποιημένο (UV-RV) RV1b ρινοϊό. Μετά από 8 ώρες, 1, 4 και 7 μέρες βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα αναλύθηκε για την παρουσία ουδετερόφιλων (neutrophils), μακροφάγων (macrophages), λεμφοκυττάρων (lymphocytes) και ηωσινόφιλων (eosinophils).

Για τη μελέτη της ωρίμανσης του ανοσοποιητικού συστήματος στους μύες, απομονώθηκε περιφερικό αίμα από μύες νεογνικής έως ενήλικης ηλικίας (Εικόνα 2) και ενεργοποιήθηκε σε καλλιέργειες παρουσία ή μη συγκεκριμένων συνδετών για τους Toll υποδοχείς. Σε μύες ηλικίας 7 ημερών, παρατηρήθηκε ανοσιακή απόκριση μόνο έπειτα από ενεργοποίηση του TLR4 υποδοχέα με τον συνδέτη LPS. Πιο συγκεκριμένα, η έκκριση των προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών TNFα και IL-6 ήταν ιδιαίτερα περιορισμένη, σε αντίθεση με τα υψηλά επίπεδα παραγωγής της αντι-φλεγμονώδους κυτταροκίνης IL-10 (Εικόνα 3). Στην ηλικιακή ομάδα των 14 ημερών παρατηρήθηκε ενεργοποίηση και του TLR7 υποδοχέα μετά από έκθεση στον συνδέτη R848, με αποτέλεσμα να παραχθούν σχετικά υψηλά επίπεδα TNFα, IL-6 και IL-10 (Εικόνα 3). Οι μύες των ηλικιακών ομάδων ενός και δύο μηνών εμφάνισαν παρόμοιες ανοσιακές αποκρίσεις στους προσδέτες LPS και R848, όσον αφορά τις προ-φλεγμονώδεις κυτταροκίνες TNFα και IL-6. Αντίθετα, στους ενός μηνός μύες τα επίπεδα της IL-10 ήταν χαμηλότερα σε σχέση με τους ενήλικες (Εικόνα 3). Ενεργοποίηση του υποδοχέα TLR2 από το συνδέτη LTA προκάλεσε έκκριση κυτταροκινών IL-10 και TNFα μόνο στους μύες ηλικίας 1 και 2 μηνών (Εικόνα 3).





Εικόνα 2: Περιφερικό αίμα συλλέχθηκε από μύες ηλικίας 7 ημερών, 14 ημερών, ενός μήνα και δύο μηνών. Ο όγκος ολικού αίματος και ο αριθμός κυττάρων που απομονώθηκε αυξάνεται σε σχέση με την ηλικία.



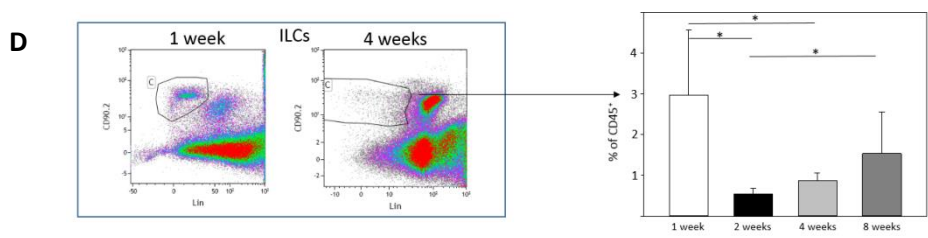
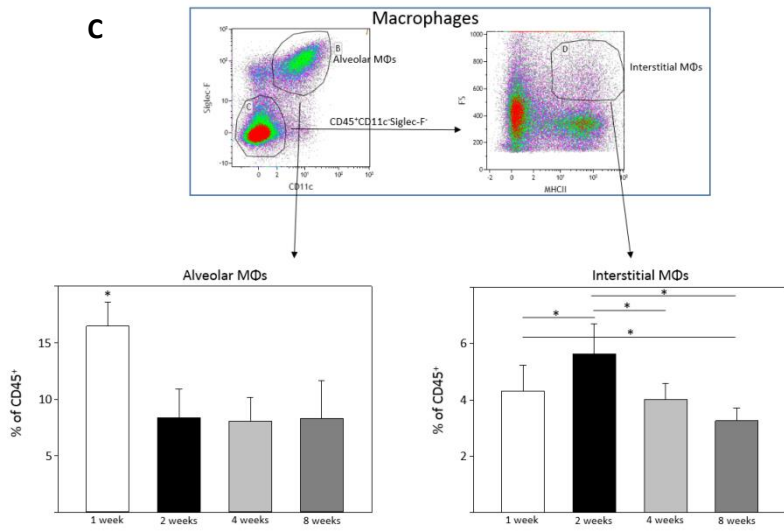
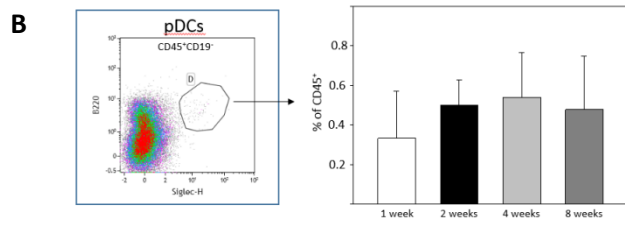
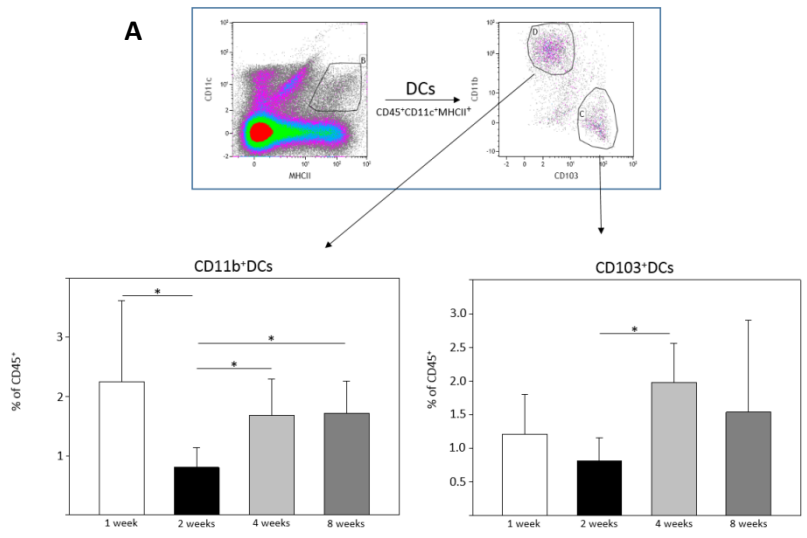
Εικόνα 3: Περιφερικό ολικό αίμα από μύες 7 ημερών, 14 ημερών, ενός μηνός και δύο μηνών ενεργοποιήθηκε σε καλλιέργειες παρουσία των συνδετών LPS, rolγl:C, R848 και LTA, που ενεργοποιούν τους Toll υποδοχείς TLR4, TLR3, TLR7 και TLR2 αντιστοίχως. Τα επίπεδα των κυτοκινών TNFα, IL-6 και IL-10 προσδιορίστηκαν έπειτα από 18 ώρες στο υπερκείμενο των καλλιεργιών με ELISA.

Η ανωριμότητα του ανοσοποιητικού συστήματος κατά τη βρεφική ηλικία αποδίδεται παραδοσιακά στην ανωριμότητα της ειδικής, και κυρίως κυτταρικής, ανοσολογικής απόκρισης. Θεωρείται ότι η καθυστερημένη ωρίμανση της Th1 ανοσίας στη μετα-νεογνική περίοδο σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο πρώιμης ευαισθητοποίησης σε αερο-αλλεργιογόνα καθώς και αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης αλλεργικής φλεγμονής.

Αυτό καθορίζεται σε σημαντικό βαθμό από τη δράση (επαρκή και αποτελεσματική λειτουργία) των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων που προσλαμβάνουν, μεταφέρουν και παρουσιάζουν αλλεργιογόνα στους τοπικούς λεμφαδένες. Ωστόσο, η ακριβής δράση των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων στην ανάπτυξη κυτταρικής ανοσίας σε σχέση με την ηλικία παραμένει ασαφής. Επιπλέον, η επιρροή διαφορετικών υποπληθυσμών τους, όπως των CD11b⁺ και CD103⁺ τυπικών δενδριτικών κυττάρων (conventional DCs) και των πλασμακυτταροειδών δενδριτικών κυττάρων (plasmacytoid DCs) και των μακροφάγων δεν είναι γνωστή. Τα τελευταία χρόνια έχει έρθει στο προσκήνιο ένας καινούριος πληθυσμός κυττάρων, τα λεγόμενα Innate Lymphoid Cells (ILCs). Αυτά τα κύτταρα έχουν χαρακτηριστικά λεμφικών κυττάρων, αλλά δεν ανταποκρίνονται στην παρουσία αντιγόνων αφού δεν έχουν υποδοχείς των T και B κυττάρων. Μέχρι στιγμής έχει δειχθεί πως αυτά τα κύτταρα παίζουν σημαντικό ρόλο σε πολλές διαδικασίες, μεταξύ των οποίων και στην ανάπτυξη αλλεργικής φλεγμονής. Προσφάτως παρατηρήθηκε πως τα ILCs εμπλέκονται άμεσα στις ρινοϊκές λοιμώξεις σε νεογνά, χωρίς ωστόσο να είναι γνωστό αν αυτό παίζει κάποιο ρόλο στη μετέπειτα προδιάθεση ανάπτυξης άσθματος.

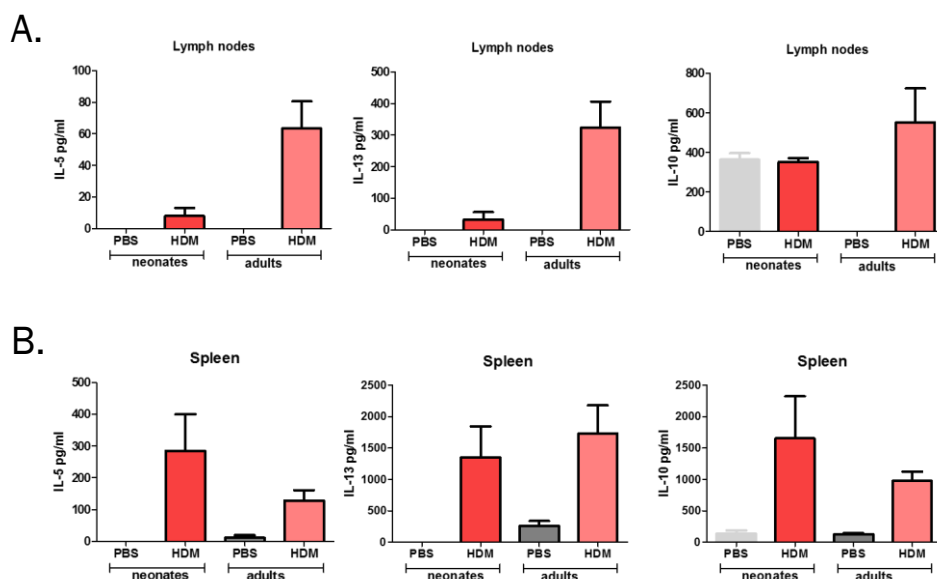
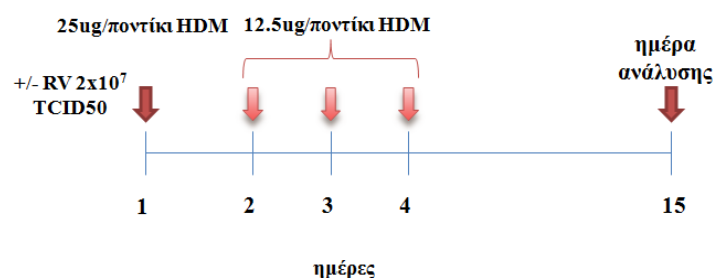
Έτσι, στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η παρουσία και μεταβολή των πιο σημαντικών υποπληθυσμών αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων στον πνεύμονα. Χρησιμοποιήθηκε κυτταρομετρία ροής και αντισώματα για τους επιφανειακούς δείκτες CD45, CD11b, CD11c, MHCII, B220 και Siglec-F για το χαρακτηρισμό των CD45⁺CD11c⁺MHCII⁺CD11b⁺CD103⁻ και CD45⁺CD11c⁺MHCII⁺CD11b⁻CD103⁺ τυπικών δενδριτικών κυττάρων, των CD45⁺CD11c⁺B220⁺Siglec-H⁺ πλασμακυτταροειδών δενδριτικών κυττάρων, των CD45⁺CD11c⁺MHCII⁺Siglec-F⁺ κυψελιδικών και των CD45⁺CD11c⁻MHCII⁺Siglec-F⁻ παρεγχυματικών μακροφάγων, όπως και των CD45⁺Lineage⁻CD90.2⁺ ILCs (Lineage cocktail B220, CD3, CD11b, CD11c, Gr-1, FcεR1a, TER-119).

Παρατηρήθηκε ότι σε μύες ηλικίας 1 εβδομάδας, τα CD11b⁺ δενδριτικά κύτταρα είναι αυξημένα ως ποσοστό των συνολικών λευκοκυττάρων, στις 2 εβδομάδες ο πληθυσμός πέφτει και μετά τον 1 μήνα σταθεροποιείται. Στο ποσοστό των CD103⁺ δενδριτικών κυττάρων, όπως και των πλασμακυτταροειδών δενδριτικών κυττάρων δεν παρατηρήθηκαν αξιοσημείωτες μεταβολές στις ηλικιακές ομάδες (Εικόνες 4A και B). Στους πληθυσμούς των μακροφάγων φαίνεται να είναι αυξημένος ο αριθμός των κυψελιδικών στα νεογνά και σταθεροποιείται σε χαμηλότερα επίπεδα από τις 2 εβδομάδες και μετά, ενώ παρόμοια πτωτική τάση φαίνεται και στα παρεγχυματικά μακροφάγα από τον 1 μήνα και μετά (Εικόνα 4C). Ενδιαφέρον παρουσιάζει και ο πληθυσμός των ILCs, όπου παρατηρούμε αυξημένο αριθμό στα νεογνά και μείωσή τους μετά τις 2 εβδομάδες (Εικόνα 4D).



Εικόνα 4. Χαρακτηρισμός των $CD45^+CD11c^+MHCII^+CD11b^+CD103^-$ και $CD45^+CD11c^+MHCII^+CD11b^-CD103^+$ τυπικών δενδριτικών κυττάρων (A), των $CD45^+CD11c^+B220^+Siglec-H^+$ πλασμακυτταροειδών δενδριτικών κυττάρων (B), των $CD45^+CD11c^+MHCII^+Siglec-F^+$ κυψελιδικών και των $CD45^+CD11c^+MHCII^+Siglec-F^-$ παρεγχυματικών μακροφάγων (C) και των ILCs (D) σε μύες ηλικίας 1, 2, 4 και 8 εβδομάδων.

Τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα μεταναστεύουν στους τοπικούς λεμφαδένες όπου παρουσιάζουν το αντιγόνο, τόσο σε καταστάσεις ομοιόστασης όσο και φλεγμονής. Για αυτό το λόγο εξετάστηκε παράλληλα η ανάπτυξη ειδικής κυτταρικής απόκρισης μετά από έκθεση μυών μέσω του αναπνευστικού στο αλλεργιογόνο house dust mite. Το πειραματικό πρωτόκολλο περιγράφεται σχηματικά στην Εικόνα 5. Παρατηρήθηκε ότι οι ειδικές Th2 κυτταρικές απαντήσεις έναντι του αλλεργιογόνου HDM στους θωρακικούς λεμφαδένες είναι αυξημένες σε μύες ηλικίας 1 εβδομάδας σε σχέση με τους ενήλικες μύες. Σε καλλιέργειες των κυττάρων των λεμφαδένων μυών που εκτέθηκαν σε HDM παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα των κυτταροκινών IL-5, IL-10 και IL-13 σε σχέση με τους μύες που εκτέθηκαν μόνο στο διάλυμα (PBS). Αντιθέτως στο σπλήνα οι ειδικές Th2 κυτταρικές απαντήσεις έναντι του HDM ήταν αντίστοιχες.



Εικόνα 5. Πειραματικό πρωτόκολλο HDM και χαρακτηρισμός των ειδικών Th2 κυτταρικών απαντήσεων έναντι του αλλεργιογόνου στους θωρακικούς λεμφαδένες (A) και στο σπλήνα (B) σε μύες ηλικίας 1 εβδομάδας (neonatal) και ενήλικους (adult).

Συμπεράσματα

Συνολικά, τα αποτελέσματα συνηγορούν υπέρ μιας διαφοροποιημένης ειδικής ανοσιακής απόκρισης στη νεογνική ηλικία που χαρακτηρίζεται από αυξημένη παρουσία των CD11b⁺ δενδριτικών κυττάρων και ILCs, γνωστών για το ρόλο τους στην ανάπτυξη Th2 ανοσιακών αποκρίσεων στον πνεύμονα. Είναι πιθανόν ότι κύτταρα παραγωγοί της IL-13, όπως τα ILCs, μαζί με κύτταρα που εκφράζουν FcεRI (δενδριτικά), προωθούν τη μη-ειδική παραγωγή IgE, οδηγώντας στην ανάπτυξη ατοπίας. Το γεγονός ότι στη νεογνική ηλικία επικρατούν οι τύπου 2 αποκρίσεις μπορεί να σημαίνει πως έστω και μικρές, φαινομενικά αβλαβείς, λοιμώξεις από ρινοϊούς σε αυτήν την ηλικία μπορούν να οδηγήσουν σε μόνιμες αλλαγές στην ανοσιακή απόκριση και προδιάθεση για την ανάπτυξη αλλεργικής ευαισθητοποίησης και αλλεργικών νόσων μετέπειτα στη ζωή.

Σεπτέμβριος 2015, Αθήνα